

## چکیده

**زمینه و هدف:** گنادوتروپین های انسانی شامل هورمون های گلیکوپروتئینی LH، FSH، HCG با ساختار هتروداایمر هستند که از غده هیپوفیز قدامی ترشح می شوند، هورمون های مذکور با اثر بر غدد تولیدمثلی، فعالیت گنادها را از طریق سنتز و ترشح هورمون های مختص این غدد تنظیم می کنند، هر گونه عدم تعادل در سنتز و ترشح گنادوتروپین ها بر فعالیت غدد تحت نفوذ خود اثر گذاشته و می تواند منجر به کاهش میزان باروری و در موارد شدیدتر سبب ناباروری گردد. در اغلب تکنیک های درمان ناباروری و یا فناوری های کمک باروری تجویز هورمون های LH و FSH به عنوان اصل مرکزی در روند درمان مطرح است. و در حال حاضر در اکثر موارد داروی HMG و یا HP-HMG که حاوی نسبتی مشخص از هورمون های مذکور است تجویز می شود، زیرا اثر تشدید کننده (سینرژسمی) که بین این دو هورمون وجود دارد سبب القای پاسخ مطلوب تری از گنادها شده و بازده باروری افزایش می یابد.

**روش کار:** هدف از این پژوهش کلونینگ و بیان همزمان ۳ زیرواحد از گنادوتروپین های انسانی مد نظر قرار گرفت که روش کار بدین شرح انجام پذیرفت: ابتدا ژن های کد کننده زیرواحد  $\beta$  هریک از هورمون های LH و FSH به علاوه ژن کد کننده زیرواحد  $\alpha$  مشترک بین این هورمون ها با واکنش PCR تکثیر شده و توسط تکنیک SOEing PCR به یکدیگر متصل شدند. کلونینگ قطعه ابتدا در وکتور pTG19 انجام پذیرفت و در مرحله بعدی قطعه توسط هضم آنزیمی از pTG19 خارج گشته و در شاتل وکتور بیانی pEGFP-N1 ساب کلون گردید و پس از تایید، به منظور بیان ژن، به سلول های یوکاریوتی CHO توسط ترانسفکشن انتقال یافت. بیان ژن در دو سطح سلولی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد تخلیص پروتئین توسط تکنیک کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA انجام پذیرفت.

**یافته ها:** تکنیک های تایید کلونینگ با هضم آنزیمی و واکنش PCR و تعیین توالی، صحت کلون سازه بیانی pEGFP-N1 حاوی ژن کد کننده ۳ زیرواحد از گنادوتروپین های را تایید نمودند.

نتایج حاصل از SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ صحت بیان ژن را در سلول های ترانسفکت شده CHO اثبات نمودند. و تخلیص کمپلکس هتروتراایمر پروتئینی با کروماتوگرافی تمایلی انجام پذیرفت و وسترن بلاتینگ با آنتی بادی، آنتی هیستیدین صحت پروتئین تخلیص شده را تایید نمود.

**نتیجه گیری:** کمپلکس پروتئین نو ترکیب هتروتراایمر حاصل از بیان همزمان ۳ زیرواحد از گنادوتروپین های انسانی در مقیاس آزمایشگاهی تولید گشت و توسط تست های اولیه invitro تایید گردید.

**کلید واژه ها:** گنادوتروپین های انسانی، LH، FSH، تکنیک SOEing PCR، کلونینگ، بیان همزمان

## **Cloning and co-expression 3 subunits of human gonadotropins (FSH, LH )**

**Background:** Human gonadotropins including LH, FSH, and HCG those secreted from anterior pituitary which has an important role in the reproductive system, and belong to glycoprotein hormone families with heterodimeric structure. Disruption in the endocrine secretion of these hormones, put an adverse effect on reproductive glands and sometimes lead to infertility. On trends related to infertility treatment, such as assisted reproductive technology administration external gonadotropins consider as a basic principle of treatment. Different types of gonadotropins in which derived from urea (HMG or HP-HMG) or recombinant forms are commercially available. In most cases many infertility treatment centers administered, HMG or HP-HMG because contains a 1:1 ratio of LH and FSH and synergistic effects of these hormones induce appropriate response.

**Material and methods:** The aim of this study is cloning and coexpression three subunits of human gonadotropins. In this study genes encoding  $\beta$  subunits of each LH and FSH hormones as well as gene encoding common  $\alpha$  subunit between two desire hormones were amplified by PCR reaction and these fragments were joined together by SOEing PCR techniques. SOEing PCR product was primary cloned into cloning pTG19 vector by TA cloning techniques. Afterward this product was subcloned in pEGFP-N1 expression shuttle vector. In order to expression, this construct transfected to the CHO cells. Gene expression evaluated in both cellular and molecular levels. Finally, Ni-NTA affinity chromatography was performed for purification of recombinant protein and confirmed by western blotting.

**Result:** The cloning accuracy of three subunits of human gonadotropins in pEGFP-N1 expression shuttle vector confirmed by PCR, enzymatic digestion and sequencing. The successfully simultaneous expression of three subunits of human gonadotropins in CHO

transfected cells was approved by SDS-PAGE and western blotting analysis. Purification of the heterotrimeric protein was done by Ni-NTA affinity chromatography and accuracy of this protein approved by western blotting.

**Conclusion:** Recombinant heterotrimeric protein of simultaneous expression of three subunits of human gonadotropins approved by invitro analysis and this protein produce in lab scale.

**Key words:** Human Gonadotropins, LH, FSH, SOEing PCR, Cloning, Co-expression



**Qazvin University Of Medical Sciences And Health Service**

**School of Paramedical Sciences**

**Thesis submitted for Ms.c degree in Medical Biotechnology**

Cloning and co-expression 3 subunits of human gonadotropins  
(FSH, LH )

**Supervisor :**

Dr. N. Gheibi

Dr. B. Kazemi

**Advisor:**

Dr. H. Piri

Dr. M. Bandehpour

**By:**

Afsaneh Tavasoli

**2016**